

Isolamento di **microrganismi** da **mosto** d'uva

Obiettivo Isolare microrganismi (lieviti, batteri e muffe) presenti nel mosto d'uva attraverso la semina su terreni selettivi.

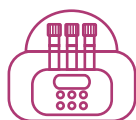
Autore Liceo Scientifico Galileo Galilei di Catania
Primo classificato Mad for Science 2023

Progetto "Per un pugno di arance: i lieviti come microrganismi di biocontrollo contro l'insorgenza di muffe sugli agrumi"



Materiali e reagenti

- Etanolo 70%
- Sacchetti gelo
- 2 becher da 1 L
- Uva biologica
- Pestello
- 3 Piastre Petri con terreno PDA
- 3 Piastre Petri con terreno SDA
- 3 Piastre Petri con terreno SMA
- 3 tubi sterili da 15 ml
- Pennarello indelebile
- Colino o garza
- Acqua distillata sterile
- Puntali sterili
- Pipette sterili
- Anse a L sterili monouso
- Parafilm®



Strumenti

- Cappa a flusso laminare
- Vortex
- Micropipette
- Pipettatore manuale o automatico
- Incubatore



Sicurezza

- Camice
- Guanti



Tempo

Circa 3 ore e mezza per preparare il mosto, circa 1 ora per la semina in piastra
2-3 giorni di incubazione per la crescita dei microrganismi



Procedimento

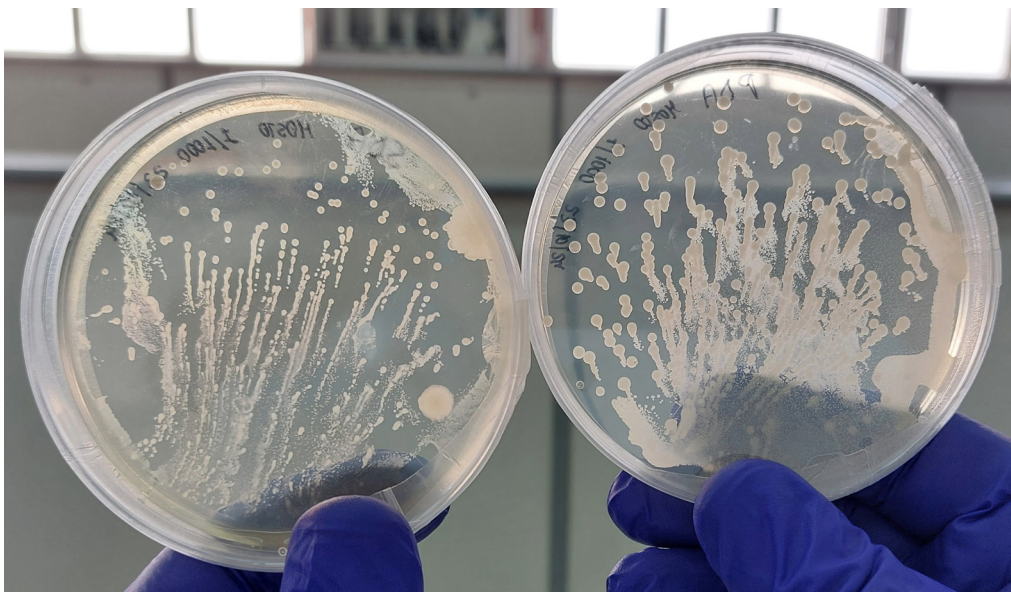
- 1.** Prima di iniziare l'esperienza, è necessario predisporre i seguenti terreni per la semina dei microrganismi: Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e Skim Milk Agar (SMA), quest'ultimo preparato secondo il protocollo "Preparazione del terreno Skim Milk Agar", disponibile nella sezione "Microbiologia". Le piastre possono essere allestite in anticipo e conservate a 4°C fino al momento dell'utilizzo.
- 2.** Per tutta la procedura di preparazione del mosto d'uva, è opportuno indossare guanti monouso e lavorare su un piano precedentemente disinfettato con Etanolo al 70%. L'utilizzo dei guanti riduce il rischio di contaminare il campione con microrganismi provenienti dalla pelle delle mani.
- 3.** Porre un becher da 1 L sul piano di lavoro, inserirvi un sacchetto gelo e collocare al suo interno un grappolo di uva biologica.
- 4.** Sempre indossando i guanti, schiacciare l'uva con le mani oppure aiutandosi con un pestello fino ad ottenere una sospensione di liquido, bucce, semi e frammenti di raspo.
- 5.** Chiudere il sacchetto per limitare il rischio di contaminazioni e lasciare macerare il mosto sul bancone a temperatura ambiente per 2-3 ore all'interno del sacchetto, come mostrato nell'immagine. In alternativa, conservare in frigorifero per tutta la notte per rallentare l'insorgere di processi fermentativi nei lieviti.



Macerazione del mosto d'uva in un sacchetto gelo chiuso all'interno di un becher

6. Durante la fase di macerazione del mosto, prelevare dal frigorifero tre piastre Petri con il terreno PDA, tre con il terreno SDA e tre con il terreno SMA e lasciarle a temperatura ambiente sul bancone per circa 30 minuti, in modo da evitare la formazione di condensa sulla superficie del terreno durante la semina.
7. Al termine della fase di macerazione, sempre indossando i guanti, predisporre un becher pulito per la filtrazione: filtrare il mosto con un colino o una garza posizionati sopra al becher, spremendo bene i residui con le mani per recuperare la maggior parte del liquido.
8. Accendere la cappa biologica a flusso laminare, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70% e posizionare nella porzione centrale tubi, pipette e puntali sterili, le micropipette e il pipettatore.
9. Sotto cappa biologica, predisporre tre tubi sterili da 15 ml per la diluizione seriale del mosto. Contrassegnarli con un pennarello indelebile come soluzioni A, B e C, che conterranno rispettivamente le diluizioni 1:10, 1:100 e 1:1000 del mosto filtrato.
10. Utilizzando un pipettatore, trasferire con una pipetta 9 ml di acqua distillata sterile in ciascun tubo preparato al punto precedente.
11. Per preparare la soluzione A, utilizzando puntali sterili da 1000 µl, aggiungere nel tubo A 1 ml di mosto filtrato. Chiudere il tappo e agitare per inversione alcune volte, oppure mescolare a bassa velocità con un vortex.
12. Per preparare la soluzione B, impiegando puntali sterili, trasferire 1 ml della soluzione A nel tubo B. Chiudere il tappo e agitare per inversione alcune volte, oppure mescolare a bassa velocità con un vortex.
13. Per preparare la soluzione C, trasferire 1 ml della soluzione B nel tubo C. Chiudere il tappo e agitare per inversione alcune volte, oppure mescolare a bassa velocità con un vortex.
14. Spostare sotto cappa le piastre Petri: tre con terreno PDA, tre con terreno SDA e tre con terreno SMA. Marcare il bordo di ciascuna piastra con la data, il nome del terreno e ciò che verrà inoculato all'interno: nella prima piastra verrà seminato il mosto diluito 1:1000 e nella seconda il mosto filtrato. La terza piastra sarà utilizzata come controllo negativo senza inoculo di mosto per verificare l'assenza di contaminazioni del terreno o ambientali.
15. Sotto cappa biologica, trasferire con un puntale sterile 100 µl della soluzione C nel centro della piastra con terreno PDA, facendo attenzione a non toccare il terreno con il puntale. Con un'ansa a L sterile distribuire uniformemente la soluzione sulla superficie del terreno fino a completo assorbimento. Ripetere il procedimento per la semina nella piastra con terreno SDA e in quella con terreno SMA, cambiando ansa e puntale ad ogni piastra.

- 16.** Ripetere il procedimento per seminare 100 µl di mosto filtrato nella piastra con terreno PDA, in quella con terreno SDA e in quella con terreno SMA, cambiando ansa e puntale ad ogni piastra. Questo set di piastre sarà utilizzato come controllo positivo per la crescita dei microrganismi.
- 17.** Al termine delle operazioni, liberare la cappa biologica dal materiale utilizzato, pulire il piano di lavoro con Etanolo 70%, chiudere il vetro e sterilizzare l'ambiente interno con la luce a raggi UV.
- 18.** Trasferire le piastre nell' incubatore con temperatura impostata a 25°C per 2-3 giorni, monitorando la crescita su base quotidiana.
- 19.** Dopo qualche giorno, si otterranno diverse colonie di microrganismi con caratteristiche morfologiche differenti. Osservare e confrontarne la crescita sui tre terreni utilizzati annotando forma, dimensione, colore, consistenza ed eventuali caratteristiche peculiari. Come mostrato nell'immagine, l'identificazione dei microrganismi risulta più semplice nelle piastre inoculate con il mosto diluito 1:1000, poiché la minore densità di crescita favorisce la comparsa di colonie ben separate tra loro. Alcune di esse possono essere selezionate per il successivo ottenimento di colture pure e la loro caratterizzazione microscopica, seguendo il protocollo "Analisi microscopica di colture pure di microrganismi isolati da mosto d'uva" all'interno della sezione "Microscopia".
- 20.** Al termine delle osservazioni, sigillare i bordi delle piastre con Parafilm® e conservarle a 4°C per una o due settimane per eventuali analisi successive.



*Crescita dei microrganismi da mosto d'uva diluito 1:1000
in terreno SDA (piastra a sinistra) e PDA (piastra a destra)*

Note

- Questo protocollo consente di isolare lieviti fermentativi e non fermentativi, batteri ambientali e lattici, oltre a muffe filamentose, che crescono sulla superficie degli acini. Essa, infatti, ospita una comunità microbica molto ricca, la cui composizione dipende dalla varietà di uva coltivata, dalle condizioni climatiche e dalle caratteristiche del terreno.
- La macerazione favorisce il trasferimento dei microrganismi dalla superficie degli acini al mosto, rendendoli disponibili per la semina sui terreni di coltura. Tuttavia, è importante non prolungare eccessivamente questa fase per evitare l'avvio di processi fermentativi spontanei. A contatto con gli zuccheri del mosto, i lieviti presenti sulla buccia dell'uva possono, infatti, iniziare a moltiplicarsi velocemente, innescando la fermentazione alcolica. Durante questo processo vengono prodotti alcol etilico e anidride carbonica, spesso osservabile sotto forma di bollicine. L'accumulo di alcol può modificare la composizione della popolazione microbica presente nel campione, influenzando così i risultati dell'esperimento. Per questo motivo si consiglia di procedere rapidamente con la lavorazione, oppure di conservare il mosto in frigorifero per alcune ore (o durante la notte) al fine di rallentare il metabolismo dei microrganismi.
- Il sacchetto gelo viene inserito all'interno di un becher per garantire una maggiore sicurezza durante la pestatura dell'uva. In caso di perforazione o rottura accidentale del sacchetto, il mosto viene raccolto dal becher evitando perdite di campione e possibili contaminazioni dell'area di lavoro.
- Il **Potato Dextrose Agar** (PDA) è un terreno ampiamente utilizzato per l'isolamento di lieviti e funghi filamentosi associati a matrici vegetali e alimentari. È costituito da:
 - Estratto di patata 4 g/L
 - Destrosio 20 g/L
 - Agar 17 g/LHa un pH finale di 5.6. Il terreno PDA può essere acquistato come terreno disidratato da ricostituire, ad esempio presso Liofilchem (codice prodotto: 610102), oppure come terreno pronto all'uso in piastra presso diversi fornitori di terreni microbiologici, come Kairosafe (codice prodotto: 20192).
- Il **Sabouraud Dextrose Agar** (SDA) è un terreno selettivo comunemente utilizzato per la crescita di lieviti e muffe. È costituito da:
 - Digestione pancreatica di caseina 5 g/L
 - Digestione peptica di tessuto animale 5 g/L
 - Destrosio 40 g/L
 - Agar 15 g/LHa un pH finale di 5.6. Il terreno SDA può essere comprato come terreno disidratato da ricostituire, ad esempio presso Liofilchem (codice prodotto: 610103), oppure come terreno pronto all'uso in piastra presso diversi fornitori di terreni microbiologici, come Kairosafe (codice prodotto: 20246).
- Lo **Skim Milk Agar** (SMA) è un terreno differenziale che permette di evidenziare eventuali attività proteolitiche attraverso la comparsa di aloni di chiarificazione attorno alle colonie. È costituito da:
 - Latte scremato in polvere 28 g/L
 - Idrolizzato enzimatico della caseina o triptone 5 g/L
 - Estratto di lievito 2.5 g/L
 - Destrosio 1 g/L
 - Agar 15 g/LHa un pH finale di 7.0. Il terreno SMA utilizzato in questa esperienza è stato preparato tramite il protocollo "Preparazione del terreno Skim Milk Agar" – disponibile nella sezione "Microbiologia" – che prevede una formulazione semplificata, ma comunque adeguata ad evidenziare l'eventuale attività proteolitica dei microrganismi isolati. Il terreno SMA può anche essere acquistato come terreno disidratato da ricostituire, ad esempio presso Liofilchem (codice prodotto: 610491), oppure come terreno pronto all'uso in piastra presso diversi fornitori di terreni microbiologici, come Hardy Diagnostics (codice prodotto: G138).
- Il protocollo "Preparazione del terreno Skim Milk Agar" utilizzato in questa esperienza riporta le procedure di allestimento, sterilizzazione e trasferimento nelle piastre che possono essere applicate anche per preparare i terreni PDA, SDA e SMA a partire da formulazioni commerciali disidratate. Tuttavia, per le quantità di polvere da utilizzare e le condizioni di sterilizzazione, si raccomanda di seguire le indicazioni riportate dal fornitore, ad esempio Liofilchem:
 - PDA: sospendere 42 g di terreno in 1 L di acqua distillata e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.
 - SDA: sospendere 65 g di terreno in 1 L di acqua distillata e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.
 - SMA: preparare una sospensione al 10% (100 g/L) in acqua distillata e sterilizzare in autoclave a 121°C per 5-10 minuti. Tempi di sterilizzazione superiori possono causare la degradazione termica dei componenti del latte, con conseguente imbrunimento del terreno e possibile alterazione delle sue caratteristiche.
- Dopo la sterilizzazione in autoclave, ciascun terreno deve essere lasciato raffreddare fino a circa 45-50°C prima del trasferimento nelle piastre Petri. A questa temperatura il terreno rimane liquido ma si riduce il rischio di formazione di condensa, che potrebbe causare la diffusione dei microrganismi sulla superficie dell'agar e rendere più difficile l'osservazione di colonie ben isolate.
- Si raccomanda di eseguire la semina del mosto sotto cappa a flusso laminare. In assenza della cappa è possibile lavorare sul bancone da laboratorio, precedentemente pulito con Etanolo 70%, in presenza della fiamma di un becco Bunsen (fare attenzione al rischio incendio!). Prestare attenzione a mantenere le condizioni di sterilità, poiché la contaminazione da parte di microrganismi ambientali potrebbe alterare la composizione delle colonie osservate e compromettere l'interpretazione dei risultati.
- Le colonie isolate possono essere mantenute a 4°C per alcune settimane su piastra. Per conservazioni più prolungate è possibile preparare stock cellulari in glicerolo sterile da conservare a -80°C o -20°C, seguendo il protocollo "Conservazione di ceppi di lievito" nella sezione "Microbiologia".